

EP 00/92 17



4

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

REC'D 08 DEC 2000

WIPO PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 199 45 171.0

**Anmeldetag:** 21. September 1999

**Anmelder/Inhaber:** GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit  
GmbH, Oberschleißheim/DE

**Bezeichnung:** Verfahren zur Identifizierung von MHC-restringierten  
Antigenen

**IPC:** C 12 Q, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 19. September 2000  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Nietiedt

PATENT- UND MARKENANWÄLTE  
EUROPEAN PATENT AND TRADEMARK ATTORNEYS

DR. rer.nat. HORST REINHARD (+1998)  
DIPL.- ING. UDO SKUHRA  
DIPL.- ING. REINHARD WEISE  
DR. rer.nat. WERNER BEHNISCH  
DR. rer.nat. STEPHAN BARTH  
DIPL.- ING. JÜRGEN METZLER\*  
DIPL.- DIPL.- ING. GLYN CHARLES (DPA)

FRIEDRICHSTR. 31 \*MOHRENSTR. 20  
D-80801 MÜNCHEN D-96450 COBURG  
P.O. BOX 440151 Tel. +49-9561-871538  
D-80750 MÜNCHEN Fax. +49-9561-871539  
Tel. +49-89-3816100  
Fax. +49-89-3401479

Ihr Zeichen/your ref.

Unser Zeichen/our ref.

München/Munich

P11556  
Dr.B/esh

21. September 1999

Anmelder: GSF-Forschungszentrum  
für Umwelt und Gesundheit GmbH  
Ingolstädter Landstraße 1  
85764 Oberschleißheim

## VERFAHREN ZUR IDENTIFIZIERUNG VON MHC-RESTRINGIERTEN ANTIGENEN

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur  
Identifizierung von MHC-restringierten T Zell Antigenen.

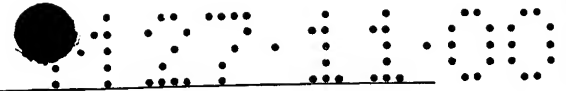
Zwei Erkenntnisse aus der Grundlagenforschung bilden die  
konzeptionelle Basis der gegenwärtigen Tumorummunologie. 1.  
Die Tumorentstehung ist Folge genetischer Veränderungen die  
zur Expression aberranter Genprodukte führt. 2. T Zellen sind  
prinzipiell in der Lage, solche Veränderungen im Proteinmuster

027.11.00

entarteter Zellen zu erkennen. Voraussetzung für die Induktion einer antitumoralen Immunantwort ist die Aktivierung Antigen-spezifischer T Zellen. Die molekulare Identifizierung von T Zell Tumor Antigenen schafft demnach die Voraussetzung für die Entwicklung Antigen- spezifischer Vakzinen sowie anderer Formen T Zell vermittelter Immuntherapien.

In den letzten Jahren wurden insbesondere beim malignen Melanom mehrere Antigene identifiziert, die von autologen T Zellen der Patienten erkannt werden. Ein möglicher therapeutische Nutzen dieser Antigene wird momentan im Rahmen klinischer Studien untersucht. Für eine breite klinische Anwendung ist es allerdings notwendig, möglichst viele Tumorantigene zu identifizieren, denn: 1. Die bisher bekannten Antigene werden in der Regel nur in einem kleinen Prozentsatz aller malignen Melanome exprimiert und sind somit nur bei einem kleinen Patientenkollektiv anwendbar. 2. Vakzinierungen mit nur einem Antigen führen häufig zur Abschaltung dieses Antigens durch den Tumor. Solcher Resistenzentwicklung soll durch eine gleichzeitige Vakzinierung mit möglichst vielen Antigenen vorgebeugt werden. 3. Da die Antigene als Peptide von HLA-Molekülen präsentiert werden und HLA-Moleküle in der menschlichen Population hoch polymorph sind, muß man sehr viele Antigene identifizieren, um für jede HLA-Konstellation eine wirksame Kombination von Antigenen zur Verfügung zu haben. Die Identifizierung weiterer Tumorantigene beim Melanom als auch bei anderen Tumoren ist somit zwingende Voraussetzung für erfolgreiche Immuntherapien.

Experimentell setzt sich die Identifizierung von Tumorantigenen aus zwei Teilschritten zusammen. Erstens, der Isolierung Tumor-spezifischer T Zellen des Patienten durch



wiederholte in vitro Stimulation mit autologen Tumorzellen. Zweitens, der molekularen Identifikation der von den T Zellen erkannten Antigene. Hierfür ist ein einfaches und allgemein anwendbares Verfahren wünschenswert.

Aus dem Stand der Technik sind bereits einige Methoden zur Identifizierung von MHC-restringierten T Zell Antigenen bekannt. Die bekannten Lösungsansätze umfassen insbesondere die folgenden Verfahren:

1. Transiente Transfektion von alloge- oder xenogenen Zelllinien;
2. Elution und HPLC Fraktionierung MHC gebundener Peptide;
3. Retrovirale Transduktion von autologen Fibroblasten.

Diese Methoden und die damit verbundenen Nachteile werden nachfolgend näher dargestellt.

1. Transiente Transfektion von alloge- oder xenogenen Zelllinien [1,2]

Diese Methode beruht auf der Expression von cDNA Banken aus Tumoren in etablierten Zelllinien. Als Zielzellen werden hierfür 293 oder COS-7 Zellen verwendet, die sich sehr effizient transfizieren lassen. Bezogen auf den HLA Genotyp des jeweiligen Patienten handelt es sich dabei allerdings um allogene (293) bzw. xenogene (COS-7)

---

Zelllinien. Da T Zellen MHC restringent sind, d.h. Antigen nur in Verbindung mit einem entsprechenden MHC Molekül erkennen, ist die Kenntnis der Restriktionselemente notwendige Voraussetzung für eine Identifizierung von Antigenen. Eine T Zell Erkennung der eingebrachten Antigene wird nur über die Co-Transfektion des jeweiligen



Restriktionselements ermöglicht. Die Identifizierung des jeweiligen Restriktionselements ist aber oftmals schwierig oder gar unmöglich. Da die verwendeten Zielzellen darüber hinaus MHC Klasse II negativ sind, ist diese Methode auf die Identifizierung von MHC Klasse I restringierten Antigenen mit bekanntem Restriktionselement beschränkt.

## 2. Biochemische Identifikation des Antigens [3]

Neben der Expressionsklonierung ist eine Identifikation von MHC Klasse I restringierten Tumorantigenen auch auf biochemischem Wege möglich. Dazu werden Tumorzellen lysiert und die restringierenden MHC Moleküle mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern immunpräzipitiert. Aus diesen MHC Molekülen werden die daran gebundenen Peptide eluiert und über reversed phase HPLC aufgetrennt. Anschließend werden Zielzellen mit den einzelnen Peptid-Fraktionen beladen. Diese Zielzellen zeichnen sich dadurch aus, daß sie nur das jeweilige Restriktionselement und in Peptid-ungebundener Form exprimieren. Die exogene Zugabe von Peptiden führt deshalb rasch zu einer Bindung durch die "leeren" MHC Moleküle. Durch Co-Kultivierung dieser Peptid-beladenen Zielzellen mit tumorspezifischen T Zellen werden positive Fraktionen identifiziert und über die Peptid-Sequenz das Antigen ermittelt. Wie bereits unter 1, so ist auch hier die Kenntnis des HLA Restriktionselements unabdingbare Voraussetzung für die Identifizierung von T

Zell Antigenen: erstens für die Immunpräzipitation der restringierenden MHC Moleküle und zweitens für die Beladung entsprechender Zielzellen mit den eluierten Peptiden. Ein zusätzlicher Nachteil liegt in der enorm großen Tumormenge, die für die Peptid-Gewinnung benötigt wird, so daß diese Methode nur bei Tumoren angewendet

werden kann, die sich gut in vitro kultivieren und expandieren lassen. Eine Identifizierung von T Zell Antigenen ist auch bei dieser Methode auf MHC Klasse I restringierte Antigene beschränkt, da eine analoge HPLC Fraktionierung von MHC Klasse II Peptiden durch deren Längen-Heterogenität unmöglich ist.

### 3. Retrovirale Transduktion autologer Fibroblasten [4]

Das oben beschriebene Problem der notwendigen Identifikation des Restriktionselements wird hinfällig, wenn autologe Zielzellen für die Expression der cDNA Bank aus dem Tumor verwendet werden. Für die Durchführung eines Antigen-Screenings werden große Zellmengen benötigt, so daß als Zielzellen nur solche Zellen des Patienten in Frage kommen, die sich in vitro entsprechend expandieren lassen. Fibroblasten lassen sich aus kleinen Hautbiopsien gewinnen und zudem sehr gut retroviral transduzieren. Die Identifikation von MHC Klasse I restringierten Antigenen durch die retrovirale Transduktion autologer Fibroblasten mit cDNAs aus Tumoren wurde deshalb als Methode vorgestellt, welche die Definition des Restriktionselements überflüssig machen soll. Diese Methode ist allerdings mit einigen Nachteilen behaftet. Primäre Fibroblasten können nur eine begrenzte Anzahl an Passagen in vitro kultiviert werden. Da Fibroblasten außerdem kein MHC Klasse II exprimieren, ist auch diese

Methode auf die Identifizierung von MHC Klasse I restringierten Antigenen beschränkt. Im Vergleich zur transienten Expressionsklonierung, wie unter 1 beschrieben, ist die retrovirale Transduktion der Zielzellen mit einem wesentlich größeren Arbeitsaufwand verbunden. Der Hauptnachteil dieser Methode ist alle

in der vergleichsweise niedrigen Expression der retroviral eingebrachten Gene zu sehen. Dieses niedrige Expressionsniveau bedingt eine im Vergleich zur transienten Transfektion etwa 10-fach geringere Sensitivität und somit einen 10-fach höheren Screening-Aufwand.

Es ist eine Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren bereitzustellen, daß die oben beschriebenen Nachteile des Standes der Technik vermeidet, insbesondere eine Kenntnis des restringierenden MHC Moleküls nicht erfordert, eine unbegrenzte Proliferation der Antikörper produzierenden B Zellen erlaubt und gleichzeitig eine Identifizierung sowohl von MHC I und II restringierten Antigenen ermöglicht.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch das Verfahren nach Anspruch 1 gelöst. Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen, der nachfolgenden Beschreibung sowie den Ausführungsbeispielen und Abbildungen. Die Abbildungen zeigen:

Abbildung 1                      LCL Infektion mit Influenza

Abbildung 2                      Präsentation des Modellantigens im Kontext von MHC Klasse II Molekülen. LCL 1.11 wurden mit wildtyp (wt) bzw. rekombinanten Influenza Viren infiziert. Nach viraler Transduktion des Modellantigens (MA) in LCL 1.11 kommt es zu einer GM-CSF Freisetzung durch den Modellantigenspezifischen T Zell Klon, nicht aber nach wildtyp Virus (wt) Infektion oder nach Infektion mit GFP-Gen tragenden Influenza Viren.

Der Erfindung vorausgegangen war die Etablierung von tumorspezifischen T Zell Klonen. Da T Zellen Antigene nur in Verbindung mit MHC Molekülen erkennen, bei einigen Klonen eine Identifizierung des restringierenden MHC Moleküls aber nicht möglich war, konnten bereits etablierte Methoden zur Identifizierung von T Zell Antigenen bzw. -Epitopen für diese Klone nicht angewendet werden. Da Zellen unterschiedlicher Gewebe eines Individuums identische MHC Moleküle exprimieren, wurde nach Möglichkeiten gesucht, autologe B Zellen des Patienten als Empfängerzellen für die Expression von cDNA Banken aus dem Tumor nutzbar zu machen. Vorbedingung dafür war die Etablierung eines effizienten Gentransfersystems. Influenza A Virus abgeleitete Vektoren erwiesen sich für diese Anwendung überraschenderweise als besonders geeignet.

Die Verwendung von autologen LCL als Zielzellen erübrigt die teilweise schwierige bis unmögliche Identifizierung der MHC Restriktionselemente. Außerdem ermöglichen sie die Identifizierung von sowohl MHC Klasse I als auch Klasse II restringierten Antigenen. Durch die Verwendung von Influenza A Virus abgeleiteten Vektorsystemen wird erstens eine einzigartig effiziente Infektion von LCL erreicht. Zweitens kommt es durch die Verwendung der viruseigenen regulatorischen Elemente zu einer unübertroffen hohen Genexpression der eingebrachten Erbinformation, was eine hohe Sensitivität und somit Einfachheit des Nachweises bedingt.

Durch die Verwendung autologer LCL als Zielzellen bei der Expressionsklonierung entfällt die oftmals schwierige Identifizierung des Restriktionselements. Da LCL konstitutiv MHC Klasse I und Klasse II exprimieren, ist sowohl eine



NOV 11 00

Identifikation von MHC Klasse I restringierten Antigenen, die von zytotoxischen T Zellen erkannt werden, als auch von MHC Klasse II restringierten Antigenen, die von T Helferzellen erkannt werden, möglich.

Die Verwendung von LCL als Zielzellen setzt allerdings einen effizienten Gentransfer in diese Zellen voraus, der bisher weder durch chemische noch physikalische Transfektionsmethoden erzielt werden konnte. Über die Infektionsrate von LCL mit Viren ist vergleichsweise wenig bekannt. Die hier beschriebene Nutzung von Influenza A Virus abgeleiteten Vektoren für den Gentransfer in LCL setzte deshalb erst eine Bestimmung der Infektionseffizienz voraus. Wie in Abbildung 1 gezeigt, werden bis zu 80% der lymphoblastoiden Zelllinien LCL1.26 mit Influenza infiziert.

Neben einer hohen Infektionsrate mußten für die beabsichtigte Anwendung auch folgende Voraussetzungen erfüllt sein. Es war jedoch unklar und nicht vorhersehbar, ob die erfindungsgemäße Kombination einzelner Verfahrensschritte die Problemstellung der Erfindung löst.

#### 1. Expressionsniveau des eingebrachten Fremdgens?

Für eine hohe Sensitivität des Nachweisverfahrens ist eine hohe Expressionsrate der in die Zellen eingebrachten Fremdsequenz essentiell. Durch die Nutzung der viralen

---

Transkriptions/Translations-Maschinerie konnte, wie in Western Analysen für ein Modellantigen nachgewiesen, eine etwa 5-fach höhere Expressionsrate als nach transienter Transfektion und ein etwa 10-fach höheres Expressionsniveau als nach retroviraler Transduktion erzielt werden.

## 2. Virale Interferenz mit Antigen Präsentation und Erkennung?

Für mehrere Viren ist bekannt, daß sie mit der Antigenpräsentation interferieren und so einer Immunerkennung entgehen. Um für Influenza analoge Mechanismen auszuschließen, wurde ein Modellantigen in Influenza eingebracht und LCLs damit infiziert. Die MHC Präsentation des Modellantigens wurde durch einen Modellantigen-spezifischen T Zell Klon ermittelt. Wie in Abbildung 2 gezeigt, interferiert Influenza nicht mit der Präsentation des Antigens. Darüber hinaus kommt es durch die Influenza-Infektion weder zu einer unspezifischen T Zell Aktivierung noch zu einer Zytokinfreisetzung durch die infizierten LCL.

## 3. Infektion der T Zellen?

Der Nachweis einer T Zell Aktivierung setzt eine mindestens 20-stündige Co-Kultivierung von Zielzellen und T Zellen voraus. Eine mögliche Infektion von T Zellen durch Influenza (aus dem Überstand oder freigesetzt aus LCL) und nach 8 Stunden einsetzende Lyse der Zellen würde den Nachweis einer spezifischen T Zell Aktivierung unmöglich machen. Wie ebenfalls mit Hilfe des GFP nachgewiesen werden konnte, infiziert Influenza T Zellen unerwartet nicht.

Zur Bestimmung der Influenza-Infektionsrate von LCL wurde die Zelllinie LCL 1.26 mit rekombinanten Influenzaviren inkubiert, welche das Gen für das Green Fluorescence Protein tragen. Nach 24 Stunden wurden die unter UV Licht grün leuchtenden Zellen gezählt.

Nachfolgend wird die Erfindung allgemein dargestellt.

Ein möglicher Ausgangspunkt des Verfahrens der Erfindung ist die Isolierung von mRNA aus Zellen, deren Antigene einer Untersuchung unterzogen werden sollen. Hierzu werden insbesondere Zellen humanen Ursprungs eingesetzt, wobei selbstverständlich auch Zellen tierischen Ursprungs, beispielsweise aus Nagern wie Mäusen oder Ratten, verwendbar sind. Bevorzugt handelt es sich um Zellen aus einem Patienten der an einem Tumor leidet, z. B. einem Tumor des blutbildenden Systems wie einem B Zell Tumor, z. B. einer Leukämie. Generell läßt sich das Verfahren auf die Identifizierung von Antigenen anwenden, die von T Zellen erkannt werden, einschließlich von Autoantigenen und mikrobiellen Antigenen. Beispiele hierfür sind Infektionen einer Zelle mit einem Bakterium, Virus, Pilz oder Protozoon oder einer beliebigen Mischinfektion.

Die Isolierung der mRNA erfolgt durch an sich bekannte molekularbiologische Methoden. Die mRNA wird anschließend durch ebenfalls bekannte Techniken in ihre cDNA umgeschrieben, um eine cDNA-Bank der Zelle zu gewinnen. Es wird hier auf die obigen Veröffentlichungen verwiesen.

Die auf der cDNA festgelegte Information wird nunmehr in die Hülle von Influenzaviren eingebracht.

In einer bevorzugten Ausgestaltung werden die so transfizierten Zellen mit Influenza A Virus überinfiziert. Die in den Zellkulturüberstand freigesetzten Viren werden geerntet und wahlweise weiter konzentriert.

In einem nächsten Schritt werden B Zellen, die aus dem gleichen Spender wie die Zellen stammen, aus denen die mRNA gewonnen wurde, also autolog sind, mit den rekombinanten

Viruspartikeln, die ein oder mehrere Kopien der cDNAs als negativ-Strang RNAs in ihrer Virushülle enthalten, infiziert. Die B Zellen müssen vor der Infektion durch EBV-Gene immortalisiert werden.

Durch die Infektion der immortalisierten autologen B Zellen kommt es zu einer Expression der aus der Ursprungszelle stammenden pseudoviralen Gensegmente, die ähnlich wie viruseigene negativ-Strang RNAs als Proteine exprimiert werden. Spaltprodukte dieser Proteine werden durch die zelleigene Antigen-Präsentationsmaschinerie in Verbindung mit MHC Molekülen auf der Zelloberfläche der B Zellen präsentiert, wo sie von Antigen-spezifischen T Zellen erkannt werden können.

In einem nächsten Schritt werden deshalb nach Infektion T Zellen, die eine Spezifität für das zu identifizierende Antigen besitzen, mit den Influenza Virus infizierten B Zellen co-kultiviert. Wurde durch die Influenza-Viren eine cDNA in die B Zellen eingeschleust und exprimiert, welche für das von den T Zellen erkannte Antigen kodiert, kommt es zu einer Stimulation der Antigen-spezifischen T Zellen verbunden mit einer Freisetzung von Zytokinen, die durch an sich bekannte Methoden, z. B. ELISA-Verfahren, nachweisbar ist. Durch Vereinzelung der Zellen, die das Antigen exprimieren, kann in einem folgenden Schritt die Identifizierung des von den T Zellen erkannten Antigens erfolgen.

In alternativen Ausgestaltungen der Erfindung wird nicht von einer cDNA-Bank ausgegangen, sondern von einer Genbank, und es werden die hierfür notwendigen Abwandlungen der oben dargestellten Schritte vorgenommen, um rekombinante pseudo-

---

Literatur

1. Boon, T. (1993). Tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes; present perspectives for specific immunotherapy. *Int. J. Cancer* 54; 177-180.
  2. Rosenberg, S.A. (1996). Development of cancer immunotherapies based on identification of genes encoding cancer regression antigens. *J. Natl. Cancer Inst.* 88; 1635-1644.
  3. Cox, A.L., Skipper, J., Chen, Y., Henderson, R.A., Darrow, T.L., Shabanowitz, J., Engelhard, V. H., Hunt, D.F., and Slingluff, C.L. (1994). Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytolytic T cell lines. *Science* 264; 716 - 719.
  4. Wang, R.F., Wang, X., Johnston, S.L., Zeng, g., Robbins, P.F., and Rosenberg, S.A. (1998). Development of a retrovirus-based complementary DNA expression system for the cloning of tumor antigens. *Cancer Res.* 58; 3519-3525.
-

PATENT- UND MARKENANWÄLTE  
EUROPEAN PATENT AND TRADEMARK ATTORNEYS

DR. rer.nat. HORST REINHARD (+1998)  
DIPL.- ING. UDO SKUHRA  
DIPL.- ING. REINHARD WEISE  
DR. rer.nat. WERNER BEHNISCH  
DR. rer.nat. STEPHAN BARTH  
DIPL.- ING. JÜRGEN METZLER\*  
DIPL.- DIPL.- ING. GLYN CHARLES (DPA)

FRIEDRICHSTR. 31 D-80801 MÜNCHEN  
P.O. BOX 440151 D-80750 MÜNCHEN  
Tel. +49-89-3816100  
Fax. +49-89-3401479

\* MOHRENSTR. 20  
D-96450 COBURG  
Tel. +49-9561-871538  
Fax. +49-9561-871539

Ihr Zeichen/your ref.

Unser Zeichen/our ref.

München/Munich

P11556  
Dr.B/esh

21. September 1999

Anmelder:

GSF-Forschungszentrum  
für Umwelt und Gesundheit GmbH  
Ingolstädter Landstraße 1  
85764 Oberschleißheim

VERFAHREN ZUR IDENTIFIZIERUNG VON  
MHC-RESTRINGIERTEN ANTIGENEN

P A T E N T A N S P R Ü C H E

1. Verfahren zur Identifizierung von MHC-restringierten  
Antigenen mit den nachfolgenden Schritten:

- a) Herstellen einer Genbank oder cDNA-Bank aus einer zu untersuchenden Zelle oder einem zu untersuchenden Mikroorganismus;
- b) Herstellen rekombinanter Influenza-Viren oder Retroviren, die in ihrer Virushülle ein oder mehrere rekombinante pseudo-virale, von der cDNA oder der DNA der Genbank abgeleitete Gensegmente enthalten;
- c) Gewinnen der rekombinanten Viruspartikel;
- d) Infizieren von immortalisierten autologen Zellen, die HLA I und/oder II-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren, mit den rekombinanten Viruspartikeln;
- e) Exprimieren von durch die cDNA oder die DNA der Genbank kodierten Proteinen in den B Zellen und Präsentieren der von der B Zelle erzeugten Spaltprodukte dieser Proteine auf der Zelloberfläche in Verbindung mit MHC Molekülen;
- f) Co-Kultivieren von T-Zellen mit den B Zellen;
- g) Stimulieren der T Zellen durch solche B Zellen, die ein durch die T Zellen erkanntes Antigen auf ihrer Zelloberfläche präsentieren;
- h) Vereinzelung der Klone, die das Antigen exprimieren, und Identifizieren des Antigens.

2. Verfahren nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, daß  
als Zelle eine tierische oder humane Eukaryontenzelle  
ausgewählt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,  
dadurch gekennzeichnet, daß  
als Eukaryontenzelle eine Tumorzelle oder eine durch einen  
Mikroorganismus infizierte Zelle eingesetzt wird.

4. Verfahren nach Anspruch 3,  
dadurch gekennzeichnet, daß

eine durch einen Virus oder ein Bakterium oder einen Pilz oder einen Protozoen oder aus einer Kombination eines oder mehrerer dieser Mikroorganismen infizierte Zelle eingesetzt wird.

5. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet, daß

das Herstellen rekombinanter Influenza-Viren durch das Einbringen von von der cDNA oder der DNA der Genbank abgeleiteten negativ-Strang RNAs in die Hülle von Influenza-Viren erfolgt.

6. Verfahren nach Anspruch 5,

dadurch gekennzeichnet, daß

als Influenza-Viren Influenza A-Viren und als Retroviren HIV eingesetzt werden.

7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6,

dadurch gekennzeichnet, daß

die Herstellung der negativ-Strang RNA durch Transkription der pseudoviralen Gensegmente mit der RNA Polymerase I erfolgt.

8. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,

---

dadurch gekennzeichnet, daß

nach Einbringen der cDNA oder der DNA der Genbank eine Überinfektion mit Wildtyp Influenza A-Virus erfolgt.

9. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,



10.27.11.00

dadurch gekennzeichnet, daß  
durch Selektion eine Anreicherung der rekombinanten  
Viruspartikel erfolgt.

10. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden  
Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet, daß  
die Spaltprodukte der Proteine in Verbindung mit MHC I oder  
MHC II auf der B Zelle präsentiert werden.

11. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden  
Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet, daß  
die Stimulation der Antigen spezifischen T Zellen durch  
Freisetzung von Zytokinen erfolgt.

12. Verfahren nach Anspruch 11,

dadurch gekennzeichnet, daß  
die Freisetzung der Zytokine durch ein ELISA Verfahren  
nachgewiesen wird.

13. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden  
Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet, daß  
zum Immortalisieren der autologen B Zellen zumindest die Gene  
EBNA1 und EBNA2 von EBV eingesetzt werden.

14. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden  
Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet, daß

die Co-Kultivierung der B Zellen mit T Helferzellen bei MHC Klasse II restringierten Antigenen und mit zytotoxischen T Zellen bei MHC Klasse I restringierten Antigenen erfolgt.

15. Verfahren nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, daß die Genbank oder cDNA-Bank aus einem Virus, einem Bakterium, einem Pilz oder einem Protozoen hergestellt wird.

16. Verfahren nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, daß die Immortalisierung der autologen Zellen mit Hilfe von EBV-Genen erfolgt.

17. Verfahren nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, daß als autologe Zellen B Zellen oder dendritische Zellen infiziert werden.

Zusammenfassung

827.1100

Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren zur Identifizierung von MHC-restringierten Antigenen.

Abbildung 1

127.11.00

### LCL Infektion mit Influenza

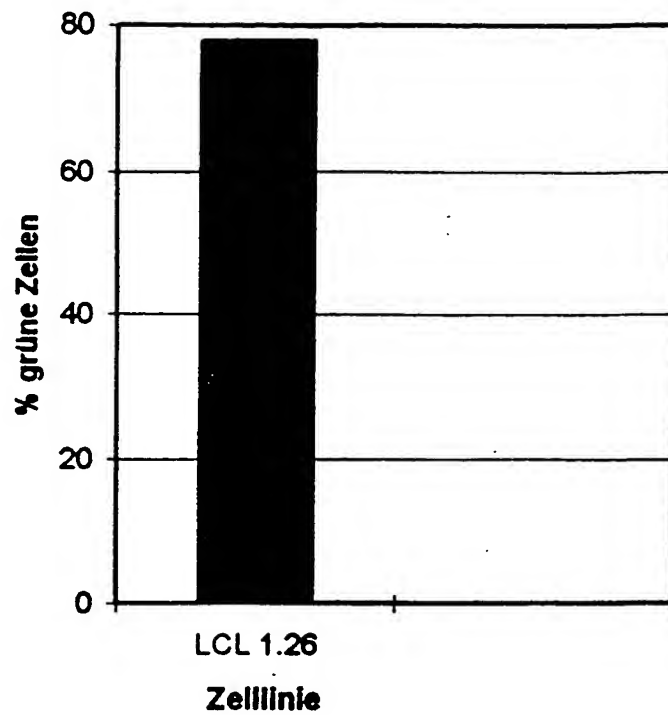


Abbildung 2

### Präsentation des Modellantigens im Kontext von MHC II

